

На правах рукописи



НАУМЕНКО Екатерина Анатольевна

**УЧАСТИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПРОЦЕССЕ
АЭРОБНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ 2,4,6-ТРИНИТРОТОЛУОЛА**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2008

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В. И. Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Наумова Римма Павловна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Коксин Владимир Петрович
(Лаборатория биохимии РЦПБ СПИД,
г. Казань)

доктор биологических наук, профессор
Леонтьевский Алексей Аркадьевич
(Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г.
Пушино)

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики
КНЦ РАН, г. Казань

Защита диссертации состоится «25» сентября 2008 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н. И. Лобачевского при Казанском государственном университете.

Автореферат разослан « » августа 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

З. И. Абрамова

Актуальность проблемы. Присутствие устойчивых химических токсикантов в окружающей среде вызывает всеобщую озабоченность в связи с воздействием этих загрязнителей на природные объекты и организм человека. Антропогенное влияние на окружающую среду приводит к ее загрязнению химически синтезированными соединениями – ксенобиотиками, которые содержат элементы химической структуры, редко или никогда не встречающиеся в природе. В связи с этим такие ксенобиотики не распознаются существующими ферментами биodeградации и, как следствие, они циркулируют и накапливаются в живых организмах и окружающей среде [Наумова, 1985; Peres, Agatos, 2000]. Нитроароматические соединения, одна из широко распространённых групп ксенобиотиков, используются в качестве взрывчатых веществ, гербицидов, инсектицидов, а также как сырьё для производства полимеров, красителей, лекарств. Нитроарилы составляют группу важных экологически опасных загрязнителей в связи с их относительной стабильностью в биосфере, а также токсическими и мутагенными эффектами. Среди нитроароматических соединений наибольшее распространение получил 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ), который несколько десятилетий использовался в качестве основного компонента взрывчатых смесей. Широкое применение ТНТ в ходе двух мировых войн привело к загрязнению наземных и водных экосистем.

Токсичность ТНТ и его метаболитов показана в различных тест-системах, от клеток бактерий до млекопитающих [Lachance *et al.*, 2004]. Нитроарилы, в том числе ТНТ, выступают как причина апластической анемии, нарушений функций печени, развития катаракты. Кроме того, показана мутагенная активность ТНТ и его метаболитов по отношению к микроорганизмам и культурам клеток млекопитающих.

Абсолютное большинство микроорганизмов способно тем или иным образом воздействовать на молекулу ТНТ. Наиболее распространённым путём микробной трансформации данного соединения в аэробных условиях является последовательный двухэлектронный восстановительный механизм, приводящий к превращению нитрогруппы через нитрозо- и гидроксиламино- в аминогруппу. Наиболее полная восстановительная трансформация ТНТ до триаминотолуола выявлена только у строго анаэробных микроорганизмов [Preuss *et al.*, 1992; Funk *et al.*, 1993]. Возможно почти стехиометрическое восстановление ТНТ в ГАДНТ представителями родов *Lactobacillus* [Наумов с соавт., 1999] и *Pseudomonas* [Зарипов с соавт., 2004].

Несмотря на интерес исследователей к проблеме трансформации ТНТ, ряд принципиальных аспектов взаимодействия ксенобиотика с клетками остается неизученным. В частности, обращает на себя внимание тот факт, что вся мировая и отечественная литература, посвященная ТНТ, рассматривает либо восстановление его нитрогрупп, либо гидридное восстановление ароматического кольца. В то же время практически отсутствуют сведения о вовлечении кислорода в данный процесс и связанное с ним образование активных форм кислорода (АФК) в системе ТНТ-бактериальные клетки.

Цель данной работы – охарактеризовать участие активных форм кислорода в процессе трансформации 2,4,6-тринитротолуола клетками различного уровня организации.

Основные задачи исследования:

1. Выделить из различных источников обитания и идентифицировать микроорганизмы, трансформирующие 2,4,6-тринитротолуол по пути восстановления его нитрогрупп с преимущественным образованием гидроксиламинодинитротолуолов в качестве метаболитов
2. Выявить особенности образования активных форм кислорода метаболически различными штаммами с применением метода электронного парамагнитного резонанса, а также спектрофотометрически
3. Охарактеризовать кинетические параметры трансформации 2,4,6-тринитротолуола, сопряженной с генерацией супероксидного анион-радикала
4. Охарактеризовать особенности трансформации 2,4,6-тринитротолуола культивируемыми растительными клетками
5. Выявить изменение физиологического состояния клеток различного уровня организации при взаимодействии с 2,4,6-тринитротолуолом

Научная новизна. Впервые методом ЭПР-спектроскопии, а также с применением спектрофотометрического анализа, выявлено, что контакт бактериальных клеток с ТНТ сопряжен с генерацией АФК, в частности, супероксид-аниона и гидроксильного радикала, во внеклеточном пространстве, тогда как взаимодействие клеток с другими полинитроариллами не приводит к образованию АФК. Проведено детальное изучение качественных и количественных характеристик образования кислородных радикалов на начальном этапе трансформации ТНТ у микроорганизмов из различных физиолого-таксономических групп. Показана генерация наиболее реактивной формы кислорода гидроксильного радикала при воздействии ТНТ на клеточную суспензию *Lactobacillus plantarum*, а также вторичное образование данного типа АФК на более поздних этапах трансформации ксенобиотика штаммом *Bacillus cereus*. Впервые выявлена роль ТНТ как индуктора окислительного стресса в культуре клеток растений. С применением оригинального подхода с привлечением хелаторов и комплексного соединения железа получены приоритетные данные, свидетельствующие о роли ионов металлов с переменной валентностью в инициации трансформации ТНТ по пути одноэлектронного восстановления. В работе впервые охарактеризована роль клеточной поверхности бактерий и ассоциированных с ней переходных металлов в процессе трансформации ТНТ. Впервые при использовании метода двойного флуоресцентного окрашивания показано изменение проницаемости клеток различного уровня организации в ответ на воздействие ТНТ.

Практическая значимость. Показанная в работе внеклеточная аккумуляция АФК на раннем этапе микробной трансформации ТНТ представляет интерес в связи с высокой токсичностью кислородных радикалов. Обнаруженное нами образование АФК клеточными суспензиями при контакте с ТНТ может вносить решающий вклад в проявление

токсических и генотоксических эффектов ТНТ в отношении организмов разного эволюционного уровня. В целом, результаты данной работы позволяют по-новому взглянуть на механизмы развития профессиональных заболеваний при контакте с данным ксенобиотиком в условиях производства. Обнаружение закономерностей и предполагаемого механизма генерации АФК в процессе трансформации ТНТ бактериальными клетками позволяет пересмотреть концепцию начального этапа его микробного метаболизма. Установленная индукция окислительного стресса при взаимодействии растительных клеток с ТНТ *in vitro* имеет значение для определения оптимальных условий трансформации ксенобиотика *in vivo* при разработке стратегии фиторемедиации ТНТ-загрязненных территорий.

Связь работы с научными программами. Работа поддержана федеральными программами “Развитие научного потенциала высшей школы” РНП.2.1.1.1005, РНП.2.1.1.3222 и “Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники” ГК 02.434.11.3020, ГК 02.512.11.2050, ГК ФЦКП КГУ 02.451.11.7019, Комиссией Европейских Сообществ (грант ICA2-СТ-2000-10006), индивидуальным грантом КГУ (2008 г.).

Положения, выносимые на защиту:

1. С применением метода электронного парамагнитного резонанса, а также спектрофотометрического анализа выявлено, что начальный этап аэробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола бактериями сопряжён с образованием активных форм кислорода
2. У микроорганизмов из различных таксономических групп выявлены различия качественных и количественных характеристик генерации активных форм кислорода в ответ на контакт клеток с 2,4,6-тринитротолуолом
3. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола клетками различного уровня организации сопряжена с изменением клеточной поверхности как барьера проницаемости

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на школах-конференциях молодых ученых “Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии” (Пущино-Тула, 2006) и “Биология – наука XXI века” (Пущино, 2004, 2005, 2006, 2007), “Ломоносов-2007” (Москва, 2007), научных конференциях “Биотехнология – охране окружающей среды” (Москва, 2004, 2005, 2006), “Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии” (Казань, 2004), “Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития” (Киров, 2007), “Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии” (Екатеринбург-Пермь, 2007), “Биосистемы: организация, поведение, управление” (Нижний Новгород, 2007), международной конференции “Modern development of magnetic resonance” (Kazan, 2007), а также на итоговых конференциях КГУ (2005-2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 научные работы.

Благодарности. Выражаю глубокую признательность моему научному руководителю Наумовой Римме Павловне за разработку интересной научной темы и внимательное отношение к работе. Благодарю всех тех, кто помогал мне в работе над диссертацией: Гафарова Арслана Булатовича за помощь в идентификации микроорганизмов, Силкина Николая Ивановича и Родионова Александра за проведение ЭПР-спектроскопии, Шурхно Равилю Абдулловну за помощь в проведении ВЭЖХ, Гордона Льва Хаймовича и Валитову Юлию Наильевну за предоставление возможности постановки манометрических опытов и обсуждение полученных результатов, Сальникова Вадима Владимировича и Мухитова Александра Ринатовича за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии, Румянцеву Наталью Ивановну за предоставление культуры растительных клеток, а также коллектив Лаборатории экологической биотехнологии и биомониторинга, в особенности Ложкина Андрея Петровича и Зиганшина Айрата Мансуровича, а также студентов – Субхангулову Айгуль Расыковну и Сырову Анну Викторовну. Отдельная благодарность инженерам кафедры микробиологии – Мочаловой Наиле Касимовне и Пономаревой Альфие Зарифовне.

Структура и объем диссертации Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 37 рисунков. Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 195 источников, из них 169 на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериальные штаммы и культура растительной ткани. В работе использовали репрезентативные штаммы ТНТ-трансформирующих микроорганизмов *Bacillus cereus* ZS18, *Pseudomonas putida* EN1582, выделенные из отходов нефтехимического производства, а также *Lactobacillus plantarum* IL1. Трансформацию ТНТ и образование АФК изучали также на клетках неморфогенного каллуса гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn линии 1-10, полученной из незрелого зародыша и состоящей из клеток паренхимного типа [Румянцев с соавт., 1992, 1998].

Определение видовой принадлежности бактериальных штаммов

Выделение геномной ДНК. Микроорганизмы выращивали на соответствующих твердых питательных средах (*Bacillus* sp. и *Pseudomonas* на среде МПА, *Lactobacillus* sp. на среде МРС (DeMan-Rogosa-Sharpe) [De Man *et al.*, 1960]). Выделение ДНК проводили согласно стандартной процедуре miniPrep.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для проведения ПЦР использовали смесь следующего состава: 200 мкМ dNTP, 1.5 мМ MgCl₂, 200 пкМ праймеров (forward primer 63f (CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC),

reverse primer 1387r (GGG CGG WGT GTA CAA GGC), 1324 bp) [Marchesi, *et al.*, 1998], 2.5 мкл буфера 10X, 0.5 ед ДНК-полимеразы. В кюветы для ПЦР вносили 24 мкл данного раствора и 1 мкл образца ДНК. Для проверки успешности процесса использовали стандартные маркеры.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 2400 (PerkinElmer, США) по следующей программе: денатурация: 94°C 5 мин; денатурация: 94°C, 2 мин; отжиг: 55°C, 30 сек; наращивание: 72°C, 2 мин (30 циклов); завершение: 72°C, 7 мин; подготовка к хранению: 10°C.

Секвенирование продукта ПЦР. Секвенирование проводили на секвенаторе Beckman Coulter CEQ 2000XL по стандартной процедуре согласно протоколу Beckman. Установленные нуклеотидные последовательности 16S рДНК синтезированной на матрице 16S рРНК изучаемых штаммов сравнивали с последовательностями базы данных GenBank и RibosomalDataBaseProjectII.

Трансформация ТНТ клеточными суспензиями бактерий. Бактерии предварительно культивировали до поздней экспоненциальной фазы роста. Клетки осаждали центрифугированием (9000g, 15 мин), дважды отмывали 30мМ Na₂HPO₄ / 20 мМ KH₂PO₄ (pH 7.0) и ресуспендировали в ТНТ-содержащем буфере до оптической плотности (A₆₀₀) 0.1; 0.5 или 1.0. В опытах с мертвыми клетками отмывку клеточную суспензию предварительно выдерживали в водяной бане (100°C, 15 мин). С целью определения влияния хелатирующих агентов на процесс трансформации ТНТ клетки отмывали буфером, содержащим ЭДТА или 2,2'-бипиридил. ТНТ вносили перед автоклавированием до конечной концентрации 100 мг/л.

Трансформация ТНТ клеточными суспензиями каллусной ткани. Каллус предварительно культивировали на агаризованной среде RX [Румянцева с соавт., 1998]. Каллусные культуры поддерживали в термостате при температуре 26± 2°C, в темноте, на каллусогенной среде RX, pH 5.5 – 5.6. Для получения клеточной суспензии каллусную массу переносили с агаризованной среды RX в 50мМ К-Na фосфатный буфер (pH 7.0), содержащий ТНТ. Инкубировали при 25°C в аэрируемых условиях.

Трансформация ТНТ ферроцианидом (K₄[Fe(CN)₆]). Реакцию инициировали внесением K₄[Fe(CN)₆]*3H₂O (10⁻²мМ) в 50мМ фосфатный буфер, содержащий ТНТ (100 мг/л). Об образовании феррицианида (K₃[Fe(CN)₆]) судили по увеличению поглощения при 320 нм.

Высокая эффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) продуктов трансформации ТНТ. ВЭЖХ-анализ в освобождённых от клеток инкубационных смесях проводили на хроматографе Series 200 (Perkin Elmer, США), в обращенно-фазовом варианте с использованием колонки (150 x 4.60 мм C18, Phenomenex) с детектором длин волн при 254 нм. Элюцию проводили в изократическом режиме системой растворителей ацетонитрил-вода (40:60) при скорости 0.5 мл/мин и температуре 30°C.

Определение потребления кислорода клеточными суспензиями. Потребление кислорода определяли манометрическим методом Варбурга.

Потребление O_2 инкубационными смесями с плотностью бактериальной суспензии $A_{600} = 2.0$ измеряли в том же буфере при концентрациях ТНТ 50 и 100 мг/л.

Определение активных форм кислорода (АФК)

Определение супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) адренохромным методом. К 2 мл освобожденной от клеток инкубационной жидкости добавляли 200 мкл 0.1% водного раствора гидрохлорида эpineфрина и после 15-минутной инкубации проводили измерения при 480 нм против освобожденной от клеток неокрашенной инкубационной жидкости на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, США).

ЭПР-спектроскопия АФК. ЭПР-спектры супероксида регистрировали на спектрометре ESP-300 (Bruker, Германия), при комнатной температуре ($\sim 25^\circ C$), СВЧ мощность 50 мВт, СВ частота 9.8 ГГц, амплитуда ВЧ модуляции 0.5 Гаусс. Tiron (50 мМ) добавляли к исследуемым растворам после отделения клеток, pH доводили до 9.5-10. Образцы в объеме 20 мкл помещали в стеклянные капилляры. Образование $O_2^{\cdot-}$ и гидроксильного радикала ($\cdot OH$) регистрировали также с применением спиновой ловушки DMPO при следующих параметрах ЭПР-спектроскопии: комнатная температура ($\sim 25^\circ C$), СВЧ мощность 20 мВт, модуляция поля 100 кГц, амплитуда ВЧ модуляции 1.0 Гаусс, константа времени 164 мсек. Аутентичные (эталонные) спиновые аддукты получали, применяя модельные системы образования АФК. Для генерации $O_2^{\cdot-}$ использовали ксантиноксантинооксидазную реакцию. $\cdot OH$ генерировали в реакционной системе Фентона.

Определение физиологического статуса бактериальных и растительных клеток в процессе трансформации ТНТ

Определение клеточной проницаемости методом флуоресцентного окрашивания. Флуоресцентную микроскопию бактерий и клеток каллусной культуры проводили с применением конфокального лазерного флуоресцентного микроскопа LSM 510 Meta (Carl Zeiss, Германия). Определение физиологического состояния растительных и бактериальных клеток в процессе трансформации ТНТ проводили с использованием двойного окрашивания двумя флуоресцентными красителями: пропидиум иодидом (PI) и 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI) [Shi *et al.*, 2007]. Полученные изображения анализировали с помощью компьютерной программы Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy 4.0.

Определение жизнеспособности клеток культуральными методами. Для определения способности бактериальных клеток, подвергнутых воздействию ТНТ, к пролиферации проводили их высев на МПА на различных этапах трансформации ТНТ. Учет КОЕ и диаметра колоний проводили через 24, 48 и 72 ч. Способность к размножению культивируемых растительных клеток, взаимодействовавших с ТНТ, изучали высевом на агаризованную среду RX отфильтрованных клеток, отобранных через 2 мин и 2 ч после начала трансформации ТНТ. Через 7 сут определяли уровень прироста сырой биомассы каллуса. Рост суспензионной культуры гречихи

татарской в присутствии различных концентраций ТНТ проводили в темноте в условиях принудительной аэрации. Уровень прироста биомассы измеряли через 7 сут культивирования.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов исследований осуществляли с использованием стандартного пакета *Microsoft Office Excel 2007*. Обработку данных ЭПР-спектроскопии проводили в программной среде *Origin 7.5*. Результаты представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями ($M \pm m$). В экспериментах по флуоресцентному окрашиванию клеток представлены репрезентативные данные. Для оценки статистической значимости различий между опытной и контрольной выборками использовали критерий Стьюдента, принимая $p \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Выделение и идентификация микроорганизмов

Источниками выделения бактериальных штаммов, осуществляющих преимущественно восстановление нитрогрупп, служили почва, нефтехимические шламы и кисломолочные продукты. Были отобраны 3 штамма, односторонне трансформирующих ТНТ по пути нитроредукции с образованием изомерных ГАДНТ в качестве мажорных метаболитов, способные к росту при высоких концентрациях ТНТ (100-200 мг/л). На основании физиолого-биохимических признаков данные штаммы были предварительно отнесены к родам *Bacillus* (*Bacillus sp.* ZS 18), *Pseudomonas* (*Pseudomonas sp.* EN1582) и *Lactobacillus* (*Lactobacillus sp.* IL1). Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов была проведена их идентификация с применением методов молекулярной биологии на основе анализа нуклеотидной последовательности 16S рДНК, комплементарной 16S рРНК.

Секвенирование проводили по стандартной процедуре согласно протоколу фирмы Beckman. Результаты сравнения установленных нуклеотидных последовательностей 16S рДНК изучаемых штаммов с последовательностями базы данных GenBank и Ribosomal DataBase Project II позволили с вероятностью 89-99% идентифицировать штамм *Bacillus sp.* ZS18 как *Bacillus cereus*, штамм *Pseudomonas sp.* EN1582 как *Pseudomonas putida*, штамм *Lactobacillus sp.* IL-1 как *Lactobacillus plantarum*.

2. Трансформация ТНТ интактными бактериальными клетками

Скрининг ряда грамположительных и грамотрицательных штаммов показал, что внесение клеточной массы в инкубационную смесь или ростовую среду сопровождается убылью некоторого количества ТНТ. Это начальное снижение (в пределах 4-9 мг/л) могло быть связано либо с сорбцией ТНТ бактериальными клетками, либо с его трансформацией в пределах соответствующих концентраций. Отделение клеток от инкубационных смесей с последующей экстракцией эфиром или хлороформом не выявили присутствия ТНТ, связанного с клетками.

Проведенный ВЭЖХ-анализ инкубационных смесей после отделения клеток выявил в качестве основных метаболитов изомерные ГАДНТ. Причем, в случае *L. plantarum* IL-1 и *P. putida* EN1582 имело место практически стехиометрическое превращение ТНТ в ГАДНТ, не сопровождающееся образованием моноаминопроизводных в течение всего времени эксперимента (3 ч). Начальный этап трансформации ТНТ *B. cereus* ZS18 также не был сопряжен с образованием АДНТ, но после второго часа инкубации происходило дальнейшее восстановление ксенобиотика с появлением моноаминопроизводных в инкубационной смеси. При этом концентрации 4АДНТ была незначительной и составляла 6.5-8.3 мкМ (рис.1).

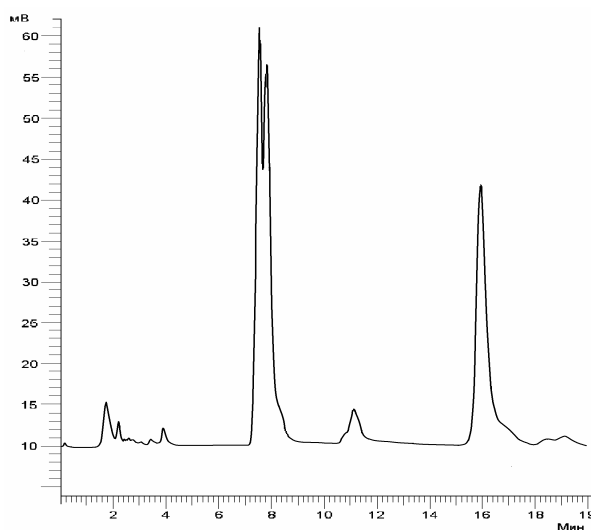


Рис. 1. ВЭЖХ инкубационной смеси при трансформации ТНТ (440 мкМ) интактными клетками *Bacillus cereus* ZS18 через 3 ч после начала инкубации.

3. Трансформация ТНТ термически инаktivированными бактериальными клетками

Моментальная убыль некоторого количества ТНТ непосредственно после внесения клеток, позволила предполагать неферментативную природу начального этапа его трансформации бактериями. Для подтверждения данного предположения необходимо было испытать инаktivированные бактериальные клетки, неспособные к росту на питательных средах.

Внесение в инкубационную смесь нежизнеспособных, термически инаktivированных клеток *B. cereus* ZS18 способствовало менее масштабному, чем в варианте с интактными клетками, однако закономерному снижению концентрации ТНТ (рис.2).

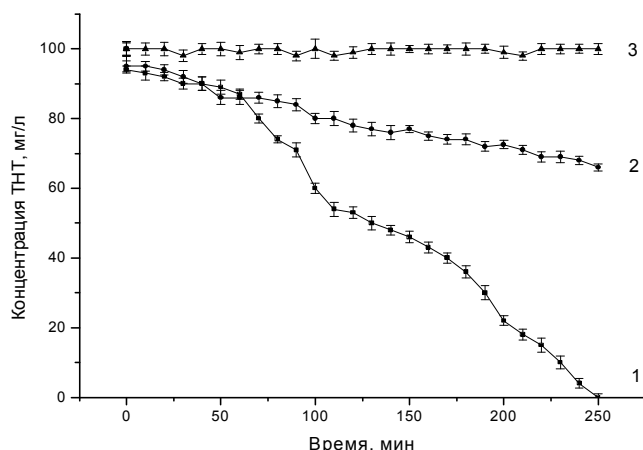


Рис. 2. Динамика убывли ТНТ в процессе инкубации клеток *B. cereus* ZS18 ($A_{600}=1.0$) в фосфатном буфере с ТНТ (100 мг/л): 1 – живые клетки + ТНТ; 2 – термически инактивированные клетки + ТНТ; 3 – ТНТ без клеток.

Характерно, что в процессе продолжительной инкубации таких клеток с ксенобиотиком обычно детектируемые с применением ВЭЖХ-анализа метаболиты, такие как ГАДНТ и АДНТ, не были выявлены.

4. Трансформация ТНТ культивируемыми клетками гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn

По результатам тестов на фитотоксичность ТНТ для изучения трансформирующей активности клеточных культур растений оптимальной можно считать концентрацию ксенобиотика 50 мг/л [Vaněk *et al.*, 2003; Ramishvili *et al.*, 2007].

Инкубация суспензии растительных клеток в фосфатном буфере с ТНТ приводила к закономерному снижению его концентрации. Для полной конверсии ТНТ в продукты его четырехэлектронного восстановления суспензией каллусных клеток требовалось 6 ч.

ВЭЖХ-анализ показал, что суспензионная культура *F. tataricum* трансформирует ТНТ по пути нитровосстановления. При этом в течение первого часа инкубации определялись изомерные ГАДНТ, далее происходила их конверсия в АДНТ, более масштабная, чем в случае бактериальных клеток (табл.).

Таблица
Метаболиты, обнаруженные в процессе трансформации ТНТ суспензией клеток *F. tataricum*

Соединение	Времена удерживаний в условиях ВЭЖХ (30 °C), мин	Концентрация метаболитов через 3 ч инкубации, мкМ (нач. концентрация ТНТ 220 мкМ)
4-ГАДНТ	7.7	15.1
2-ГАДНТ	7.9	10.3
2-АДНТ	9.8	21.2
4-АДНТ	11.2	46.3
ТНТ	16.0	102.6

Согласно данным некоторых исследователей [Ramishvili et al., 2007], убыль ТНТ в инкубационной смеси, содержащей суспензию растительных клеток, может быть обусловлена не только его превращением до известных метаболитов, но и адсорбцией ксенобиотика на поверхности клеток каллуса. Кроме того, ряд авторов отмечает, что метаболиты ТНТ также способны к необратимому связыванию с компонентами клеточных стенок, в частности, с лигниноподобными структурами, что может проявляться в отсутствии баланса между концентрацией исходного ксенобиотика и обнаруживаемых методом ВЭЖХ метаболитов [Hughes et al., 1997; Vanderford et al., 1997; Hannink et al., 2002]. Результаты, полученные нами при анализе хроматограмм, позволяют считать, что адсорбции на поверхностных структурах клеток изучаемой нами культуры подвергается не более 10% ТНТ и не более 3-5% от общего количества метаболитов нитроредукции.

5. Потребление кислорода суспензией бактериальных клеток

Для изучения роли кислорода в системе, содержащей ТНТ и клетки *B. cereus* ZS18, было проанализировано суммарное потребление кислорода в течение 2 ч. Установлено, что ТНТ усиливает потребление кислорода клеточной суспензией в 1.5-2 раза по сравнению с контролем (эндогенное дыхание в отсутствие глюкозы и ТНТ). Характерно, что превышение уровня потребления кислорода находилось в прямой зависимости от концентрации ТНТ (рис.3).

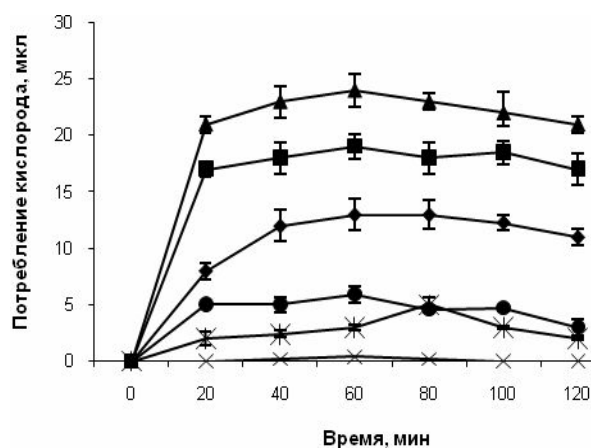


Рис. 3. Динамика потребления кислорода в системе покоящиеся клетки *Bacillus cereus* ZS18 ($A_{600}=2.0$)+ТНТ в отсутствие экзогенного дыхательного субстрата. Потребление кислорода: 1 и 2 – при концентрации ТНТ 100 и 50 мг/л, соответственно; 3 – эндогенное дыхание в отсутствие ТНТ; 4 – то же, что 1, но при добавлении 1 мг/мл NaN₃; 5 – то же, что 4, но при концентрации ТНТ 50 мг/л; 6 – то же, что 4, но в отсутствие ТНТ.

Для дифференциации собственно дыхательной активности клеток и нереспираторного потребления кислорода использовали дыхательный яд – азид натрия (NaN₃). Уже в дозе 1 мг/мл NaN₃ полностью блокировал как субстрат-индуцированное (глюкозное), так и эндогенное дыхание, не предотвращая при этом потребления кислорода в присутствии ТНТ (рис.3).

6. Образование АФК в процессе трансформации ТНТ

Феномен «недыхательного» потребления кислорода и его масштабы позволили предположить участие активных форм кислорода в трансформации ТНТ. Действительно, анализ образования O₂^{•-} с применением

реакции супероксид-зависимого превращения эpineфрина в адренохром свидетельствовал о немедленном образовании данного радикала после внесения бактериальных клеток в инкубационную смесь, содержащую ТНТ (рис.4).

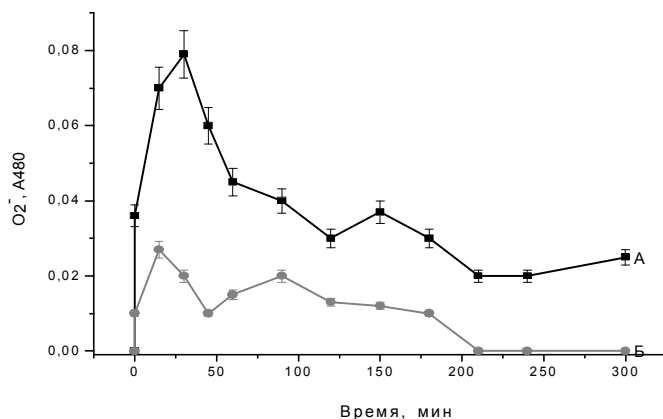


Рис. 4. Динамика образования супероксида А – в процессе трансформации ТНТ (100 мг/л) клеточной суспензией *B. cereus* ZS18; Б – то же, что А, но с добавлением 400 ед/мл СОД.

В качестве более специфичного и чувствительного метода определения генерации АФК использовали ЭПР-спектроскопию с применением двух спиновых ловушек: Tiron и DMPO, переводящих чрезвычайно нестабильные радикалы кислорода в относительно более стабильную форму. С целью определения специфичности данных ловушек применительно к $O_2^{\bullet-}$ и $\bullet OH$, а также для получения стандартных ЭПР-спектров использовали модельные реакции образования свободных радикалов – ксантиноксидазную реакцию и реакцию Фентона.

Выявлено, что как Tiron, так и DMPO при взаимодействии с реакционной смесью, содержащей $O_2^{\bullet-}$, образуют ЭПР-детектируемые спиновые аддукты: Tiron-семихинон и DMPO-ООН, соответственно, которые имеют характерные спектры (рис.5).

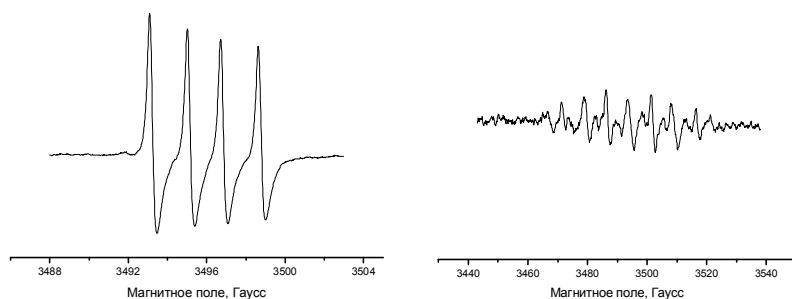


Рис. 5. Эталонные ЭПР-спектры аддуктов спиновых ловушек с $O_2^{\bullet-}$ Tiron-семихинона (А) и ДМПО-ООН (Б).

Спиновые аддукты ловушек с $\bullet OH$ также обладают определенными характеристиками ЭПР-линий (рис.6).

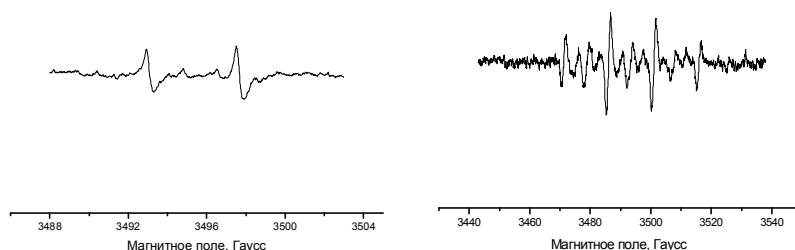


Рис. 6. Эталонные ЭПР-спектры аддуктов спиновых ловушек с $\bullet\text{OH}$: Tiron- $\bullet\text{OH}$ (А) и ДМПО- $\bullet\text{OH}$ (Б).

Сопоставление эталонных спектров с регистрируемыми в системе ТНТ+бактериальные клетки показало, что начальный этап трансформации ТНТ действительно сопряжен с генерацией $\text{O}_2^{\bullet-}$, который неизменно регистрировали в любых вариантах ТНТ+клетки при использовании спиновых ловушек. Продукция супероксида начиналась непосредственно в момент внесения суспензии клеток в ТНТ-содержащий фосфатный буфер. В большинстве случаев концентрация $\text{O}_2^{\bullet-}$ была максимальной через 15-60 мин от начала инкубации и достигала 15-20 мМ. Полная конверсия ТНТ в ГАДНТ приводила к прекращению генерации $\text{O}_2^{\bullet-}$. Оказалось, что термическая обработка клеток, использованная нами для исключения участия ферментов в изучаемых процессах, не предотвращала образования АФК, хотя приводила к резкому снижению их уровня по сравнению с живыми клетками (рис.7).

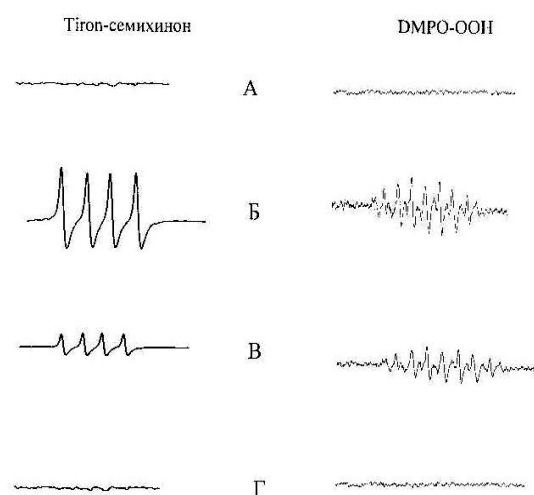


Рис. 7. ЭПР-спектры аддуктов спиновых ловушек с $\text{O}_2^{\bullet-}$, записанные А – через 15 мин после внесения интактных клеток *B. cereus* ZS18 в фосфатный буфер, Б – то же, что А, но при концентрации ТНТ 100 мг/л, В – то же, что Б, но после внесения термически инактивированных клеток, Г – то же, что Б, но спектр записан через 180 мин после внесения клеток.

Изучение зависимости уровня образования $\text{O}_2^{\bullet-}$ в начальный момент времени от концентрации ТНТ выявило, что в диапазоне концентраций 25-100 мг/л имела место пропорциональная зависимость уровня генерации $\text{O}_2^{\bullet-}$ от концентрации ксенобиотика, в то время как повышение концентрации от 100 до 150 мг/л проявлялось лишь в незначительном увеличении концентрации супероксида.

При варьировании клеточной плотности суспензии живых клеток и клеток, инактивированных термическим воздействием наблюдали усиление

ЭПР-сигнала при повышении клеточной плотности живых клеток, тогда как изменение количества мертвых клеток не позволяло выявить пропорциональную зависимость.

Анализ эталонных спектров спиновых аддуктов и их сравнение с регистрируемыми в процессе трансформации ТНТ клетками *B. cereus* ZS18, выявил сочетание в одном спектре ЭПР-линий, характерных для Tiron-семихинона и аддукта Tiron с $\bullet\text{ОН}$. Это позволило сделать вывод, что в изучаемой нами системе имеет место генерация $\text{O}_2^{\bullet-}$ и вторичное образование $\bullet\text{ОН}$. Следует отметить, что совместное присутствие $\text{O}_2^{\bullet-}$ и $\bullet\text{ОН}$ было характерно для поздней стадии инкубации клеток в растворе ТНТ (60-120 мин), тогда как в течение первых 15 мин в системе определялся исключительно $\text{O}_2^{\bullet-}$ (рис.8).

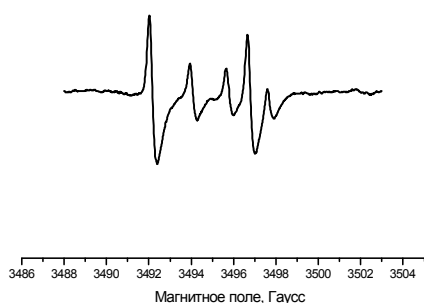


Рис. 8. ЭПР-спектр аддуктов Tiron- АФК, записанный в процессе трансформации ТНТ штаммом *B. cereus* ZS18 через 60 мин после внесения клеток.

* – линии ЭПР, соответствующие $\text{O}_2^{\bullet-}$.

В процессе трансформации ТНТ другим модельным штаммом, *P. putida* EN1582, также имело место образование $\text{O}_2^{\bullet-}$. Следует отметить, что уровень генерации $\text{O}_2^{\bullet-}$ в данной системе был выше, чем в случае трансформации ТНТ клетками *B. cereus* ZS18. При этом вторичное образование $\bullet\text{ОН}$ не наблюдалось даже на более поздних этапах трансформации ТНТ (рис.9).

Рис. 9. ЭПР-спектры аддуктов Tiron- $\text{O}_2^{\bullet-}$, записанные в процессе трансформации ТНТ штаммом *P. putida* EN1582 через 60 мин после внесения клеток.

Изучение генерации АФК в процессе трансформации ТНТ клетками *L. plantarum* IL-1 не выявило образования супероксида. Спектры ЭПР, регистрируемые в данной системе относились исключительно к аддуктам Tiron с $\bullet\text{ОН}$ (рис.10).

Рис. 10. ЭПР-спектр аддукта Tiron-•ОН, записанный в процессе трансформации ТНТ штаммом *L. plantarum* IL-1

Обращает на себя внимание, что контакт бактериальных клеток с другими нитроароматическими соединениями (ТНБК, ТНФ, 2,4ДНТ), а также стабильными метаболитами нитроредукции ТНТ (2АДНТ, 4АДНТ), внесенными в систему в концентрации, эквивалентной молярному содержанию ТНТ, не приводил к образованию кислородных радикалов, что было зафиксировано с привлечением ЭПР-спектроскопии по отсутствию характерных спектров аддуктов спиновых ловушек.

7. Образование АФК в процессе трансформации ТНТ культивируемыми клетками *F. tataricum*

Для культуры каллусных клеток гречихи татарской было характерно образование некоторого фонового уровня АФК независимо от взаимодействия с ТНТ. Однако контакт культивируемых клеток с ТНТ в условиях клеточной суспензии приводил к достоверному повышению этого уровня. При этом, в отличие от суспензии бактериальных клеток, совместное образование $O_2^{\cdot-}$ и •ОН в суспензии каллусных клеток было характерно уже для раннего этапа инкубации.

8. Влияние хелатирующих агентов на биотрансформацию ТНТ и образование АФК

С целью выяснения роли клеточной поверхности и, в частности, структур, содержащих ионы металлов с переменной валентностью, в снижении концентрации ТНТ и в образовании $O_2^{\cdot-}$, была предпринята обработка клеток *B. cereus* ZS18 хелатирующими агентами (ЭДТА и 2,2'-бипиридилем) перед их внесением в ТНТ-содержащую инкубационную смесь. Обработка клеток как ЭДТА, так и бипиридилем, приводила к торможению трансформации ТНТ. и значительно снижала уровень продукции супероксида (рис.11).

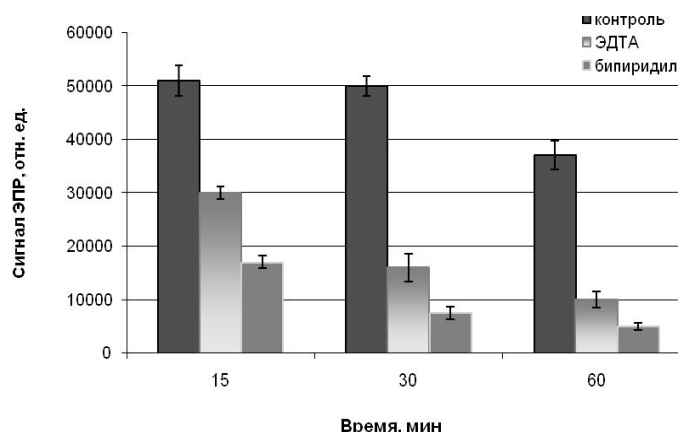


Рис. 11. Влияние хелатирующих агентов на уровень образования $O_2^{\bullet-}$ в системе клетки *B. cereus* ZS18 + TNT

9. Небиологическая трансформация TNT ферроцианидом ($K_4[Fe(CN)_6]$)

Внесение $K_4[Fe(CN)_6]$ в фосфатный буфер с TNT способствовало немедленному снижению концентрации ксенобиотика на 15% в течение первых 15 мин трансформации. Далее происходило восстановление концентрации TNT практически до исходного значения. При этом образование каких-либо продуктов восстановления TNT, детектируемых методом ВЭЖХ, не наблюдалось.

Взаимодействие данного комплексного соединения с TNT приводило к образованию красной кровяной соли ($K_3[Fe(CN)_6]$), что было определено спектрофотометрически по поглощению при 340 нм. ЭПР-спектроскопия показала генерацию $O_2^{\bullet-}$, уровень которого был сравним с таковым, регистрируемым при трансформации TNT бактериальными клетками (рис.12).

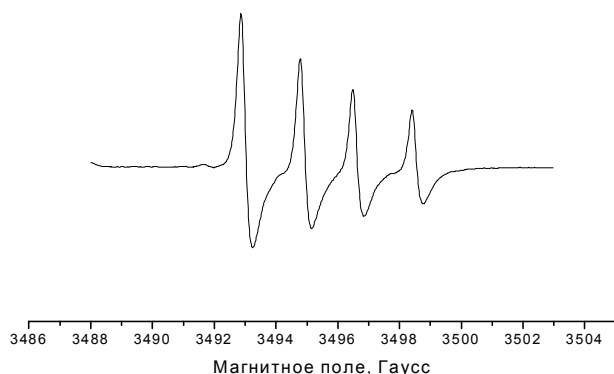


Рис. 12. ЭПР- спектр Tiron-семихинона, записанный через 15 мин после инициации трансформации TNT $K_3[Fe(CN)_6]$.

10. Оценка физиологического состояния клеток методом флуоресцентного окрашивания

С использованием лазерной конфокальной флуоресцентной микроскопии в нашем эксперименте удалось показать, что уже через 2 мин

экспозиции бактериальных клеток в фосфатном буфере с ТНТ происходят их функциональные изменения, связанные с изменением проницаемости мембран, что было выявлено по окрашиванию клеток PI. Флуоресцентная микроскопия, проведенная после конверсии 50% ТНТ в ГАДНТ, также выявила изменения проницаемости мембран либо нарушение их целостности. Таким образом, контакт бактериальных клеток с ТНТ в условиях клеточных суспензий приводит к усилению их проницаемости, что, безусловно, может быть связано с образованием АФК.

Что касается культивируемых клеток гречихи татарской, то наблюдаемая картина была аналогичной: контакт каллусных клеток с ТНТ в концентрации 50 мг/л приводил к окрашиванию 100% ядер PI.

11. Определение жизнеспособности клеток *B. cereus* и *F. tataricum* культуральным методом

Несмотря на то, что клетки, подвергнутые воздействию ТНТ, проявляли признаки изменения проницаемости клеточных мембран или нарушения их целостности, они не теряли способности к формированию колоний при посеве на оптимальную питательную среду. При этом наблюдалось замедление роста, которое может быть связано с тем, что клеткам, имеющим изменения в мембране, для перехода к размножению необходимо репарировать эти нарушения. Полученные данные позволяют говорить о бактериостатическом эффекте ТНТ, который, безусловно, связан с нарушением проницаемости клеточных мембран, которое успешно преодолевается клетками при росте на богатой питательной среде. Наблюдаемый эффект ТНТ по отношению к бактериям, вероятно, связан с генерацией АФК и сопутствующими изменениями липидных структур мембран.

Сравнение способности к регенерации каллусной ткани клетками, подвергнутыми воздействию ТНТ, с контролем (клетками, суспендированными в фосфатном буфере без ТНТ) показало, что контакт растительных клеток с ТНТ в течение 2 ч приводит к их гибели. Следовательно, трансформация большей части ТНТ каллусными клетками происходит уже после прекращения их жизнеспособности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ТНТ относится к наиболее широко распространённым компонентам взрывчатых смесей, применяемых со времени первой мировой войны. Токсический, мутагенный и канцерогенный потенциалы данного соединения были выявлены с привлечением тест-организмов различного эволюционного уровня от бактерий до млекопитающих [Амерханова, Наумова, 1979; Wyman *et al.*, 1992; Bruns-Nagel, 1996; Frishe, Hoper, 2003; Saka, M., 2004; Lachance, 2004]. С учетом реальных масштабов загрязнения тринитротолуолом почв и водных ресурсов, большое значение имеет изучение механизмов развития токсических проявлений при контакте с данным ксенобиотиком, а также прогнозирование его поведения в природных сферах и в организме человека.

Ранее в качестве первых стабильных метаболитов данного соединения обнаруживались, как правило, аминодинитротолуолы (АДНТ). ГАДНТ впервые были обнаружены методом ВЭЖХ в качестве основных метаболитов ТНТ у микромицета *Phanerochaete chrysosporium* [Michels, Gottshalk, 1994]. В дальнейшем эти продукты четырехэлектронного восстановления нитрогруппы ТНТ оказались его ключевыми метаболитами у широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий [Наумов с соавт., 1998; Зарипов с соавт., 2004].

Предпринятое нами измерение концентрации ТНТ в момент контакта бактериальных клеток с данным соединением (в условиях инкубации клеточных суспензий с ТНТ) выявило его закономерную убыль (4-9% от исходной дозы). Согласно результатам манометрических опытов, потребление кислорода при инкубации клеточных суспензий возрастает (до 1.5 – 2 раз) в варианте клетки + ТНТ по сравнению с уровнем эндогенного окисления в варианте без ТНТ. Это позволило предположить, что контакт клеток с ТНТ сопровождается генерацией АФК. Действительно, методом ЭПР-спектроскопии с использованием Tiron и DMPD в качестве спиновых ловушек, а также колориметрическим методом на основе превращения эпинефрина в адренохром мы обнаружили образование $O_2^{\bullet -}$ с последующим его преобразованием в $\bullet OH$.

Образование АФК, а также моментальный характер ответной реакции в начале контакта клеток с ТНТ позволили предположить ее неферментативную природу, аргументом в пользу которой служат и результаты опытов с мёртвыми клетками, а именно, убыль около 20% исходного ТНТ в сочетании с появлением сигнала ЭПР.

Согласно нашей гипотезе, в силу высокой электрофильности молекулы ТНТ она способна к одноэлектронному восстановлению за счет неспецифических редуцтантов, в том числе, ассоциированных с компонентами клеточной поверхности, содержащих ионы металлов с переменной валентностью (таких как железо или марганец). Присутствие переходных металлов на поверхности бактериальных клеток может быть обусловлено различными механизмами: в клетки бактерий железо из окружающей среды может транспортироваться низкомолекулярными хелатирующими агентами – сидерофорами, связывающими Fe (III) [Raymond 1994, Eisendle *et al.*, 2004], другим механизмом поглощения железа из внеклеточной среды служит восстановление хелатированного Fe (III) на поверхности клетки с участием редуктаз плазматической мембраны [Georgatsou, Alexandraki, 1994; Georgatsou, Alexandraki, 1999]. Совокупность приведённых данных позволила предположить существование редокс-цикла с участием ТНТ и кислорода. Образующийся при одноэлектронном восстановлении нитроанионный радикал нестабилен и реокисляется кислородом с образованием супероксид-аниона и регенерацией исходного соединения (рис.13).

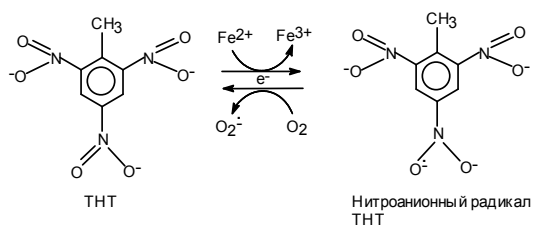


Рис. 13. Предполагаемая схема внеклеточного редокс-цикла, функционирующего на начальном этапе трансформации TNT аэробными бактериями.

В случае мертвых клеток данный шунт не сопряжен с дальнейшей трансформацией TNT по традиционному пути восстановления его нитрогрупп, независимо от присутствия глюкозы как потенциального донора электронов.

Показанное нами совместное присутствие $O_2^{\bullet-}$ и $\bullet OH$ на поздних этапах трансформации TNT клетками *B. cereus* ZS-18 вероятнее всего является следствием вторичного образования гидроксильного радикала в реакции Фентона. Но нельзя не принимать во внимание существование иного механизма формирования $\bullet OH$, основанного на взаимодействии металла активного центра СОД с H_2O_2 , что было показано методом ЭПР [Yim et al., 1990].

В числе немногих примеров индуцированного ксенобиотиками образования микроорганизмами внеклеточного супероксид-аниона известна продукция данного радикала при взаимодействии клеток *Escherichia coli* с гербицидом паракватом [Hassan, Fridovich, 1978, Carr et al., 1986]. Другой гербицид – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) – известен как индуктор апоптоза [Kaionmova et al., 2001], а также ассоциирован с лимфомой и другими видами рака [Tuschl, Shwab, 2003]. Прооксидантный эффект данного соединения показан при использовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве экспериментальной эукариотической модели [Teixeira et al., 2004]. Токсические эффекты муравьиной кислоты, широко применяемой в современной химической промышленности, также связывают с образованием свободных радикалов [Dikalova et al., 2001].

Предпринятое нами изучение формирования АФК при взаимодействии бактериальных клеток с другими ароматическими соединениями (ТНБК, ТНФ, 2,4-ДНТ, 2,6-ДНТ), а также метаболитами TNT (2-АДНТ, 4-АДНТ), проявляющими токсический эффект по отношению к различным тест-объектам, не выявило присутствия свободных радикалов в течение всего времени инкубации. В совокупности с вышесказанным данный феномен позволяет сделать вывод о том, что в случае TNT имеет место одноэлектронное восстановление молекулы ксенобиотика с вовлечением кислорода в данный процесс, нехарактерное для других нитроароматических соединений.

Принципиальная возможность одноэлектронного восстановления TNT в литературе прогнозируется некоторыми авторами в связи с реакцией, катализируемой «кислород-чувствительной» нитроредуктазой, исходным донором электронов для которой является $NAD(P)H$, а разобщение двухэлектронного потока происходит на уровне флавинов. В результате

этого процесса предполагается образование нитроанионного радикала, который может являться предшественником нитрозодинитротолуола, но может быть окислен молекулярным кислородом с регенерацией исходного ксенобиотика и образованием $O_2^{\bullet-}$ [Spain, 1995; Esteve-Núñez *et al.*, 2001]. Нами показана возможность принципиально иного механизма внеклеточной генерации $O_2^{\bullet-}$ непосредственно при контакте микробных клеток с ТНТ за счет неферментативного редокс-превращения, ассоциированного с клеточной поверхностью с участием ионов металлов с переменной валентностью. Существование такого редокс-цикла подтверждается тем, что взаимодействие не только живых, но и мёртвых бактериальных клеток с ТНТ приводило к появлению $O_2^{\bullet-}$ во внеклеточном пространстве. Более того, небιологическая трансформация ТНТ при взаимодействии с желтой кровяной солью также сопровождалось генерацией $O_2^{\bullet-}$.

Обнаруженная в нашей работе внеклеточная аккумуляция $O_2^{\bullet-}$ на раннем этапе микробной трансформации ТНТ представляет интерес в связи с высокой токсичностью данного радикала, которая проявляется в окислении липидов мембран, а также фрагментации ДНК, в развитии воспаления, в повреждении сосудов [Halliwell, Gutteridge, 1984; Huyske, *et al.*, 2002]. Данные эффекты частично связаны с собственной токсичностью $O_2^{\bullet-}$, одним из проявлений которой служит ингибирование ключевых ферментов клетки [Carlioz, Touati, 1986], Fe-S-содержащих белков, но основную роль, вероятно, играет образование вторичных, более активных форм кислорода, в том числе H_2O_2 и $\cdot OH$.

Поскольку обнаруженное нами образование супероксида клеточными суспензиями при контакте с ТНТ является общим для репрезентативных представителей родов *Bacillus*, *Lactobacillus* и *Pseudomonas*, вполне вероятно, что микрофлора человека и высших животных, подвергающихся воздействию данного ксенобиотика, также способствует внеклеточному образованию супероксидного радикала, что может вносить решающий вклад в проявление токсических и генотоксических эффектов ТНТ.

Для более широкого обоснования концепции вовлечения кислорода в процесс трансформации ТНТ с образованием АФК мы изучали взаимодействие с данным ксенобиотиком культивируемых клеток растений как модели высших эукариот. Применение асептических каллусных культур для изучения ТНТ-трансформирующей активности позволяет исключить участие микроорганизмов, а также связывания ксенобиотика с гумусовыми соединениями в почве. Используемая нами культура клеток гречихи татарской трансформировала ТНТ по пути восстановления нитрогрупп с образованием ГАДНТ в качестве ранних метаболитов, что является важным аргументом в пользу универсальности основного механизма конверсии ксенобиотика как прокариотами, так и эукариотами. Следует, однако, отметить, что наблюдалась более глубокая трансформация нитроарила, приводящая к накоплению моноаминопроизводных в качестве основных метаболитов при продолжительной инкубации растительных клеток в присутствии ТНТ, что может быть связано с наличием большего по

сравнению с бактериальными клетками пула восстановительных эквивалентов, а также разнообразием ферментативных систем редуктазной направленности.

Растения часто подвергаются общему физиологическому стрессу, неотъемлемой составляющей которого является окислительный стресс. Культивируемые растительные клетки испытывают влияние окислительного стресса в процессе роста в нормальных условиях на поздних стадиях развития культуры [Zhao *et al.*, 2005], а также под влиянием ряда факторов среды и условий культивирования [Cassels, Curry, 2001]. Кислородные радикалы образуются в растительных клетках *in vivo* и *in vitro* как побочные продукты нормального окислительного метаболизма. Изучение изолированных плазматических мембран различных растений, в том числе обработанных элиситорами, выявило NADPH-супероксид-синтазную активность [Auh and Murphy, 1995]. Контакт суспензии культивируемых растительных клеток с ТНТ в нашем эксперименте приводил значительному повышению уровня образования АФК по сравнению с наблюдаемым в культуре независимо от воздействия ксенобиотика. Таким образом, ТНТ по отношению растениям может рассматриваться как индуктор окислительного стресса.

Ввиду высокой реакционной способности АФК нельзя исключать возможности нарушений поверхностных структур клетки за счет взаимодействия со свободными радикалами. Показанное нами с применением метода флуоресцентного окрашивания увеличение проницаемости поверхности клеток различного эволюционного уровня при взаимодействии с ТНТ мы связываем с генерацией АФК, сопутствующей метаболически не опосредованной и опосредованной трансформации данного ксенобиотика клетками про- и эукариот. Нарушение проницаемости мембранных структур, вероятно, связано с реакцией перекисного окисления липидов, которая играет важную роль в развитии клеточной патологии [Владимиров, Арчаков, 1972; Владимиров, 2000].

Таким образом, вероятной причиной изменений в проницаемости мембраны как бактериальных, так и растительных клеток является генерация АФК, в частности, супероксида, который способен атаковать жирнокислотные цепи фосфолипидов, содержащие сопряженные двойные связи, с образованием гидрофобных радикалов, взаимодействующих друг с другом.

ВЫВОДЫ

1. Из различных источников обитания выделены и идентифицированы три репрезентативных штамма микроорганизмов, трансформирующих 2,4,6-тринитротолуол по пути нитроредукции с образованием гидроксиламинодинитротолуолов в качестве основных метаболитов
2. Впервые показано, что для штаммов с различными типами метаболизма характерно образование активных форм кислорода на начальном этапе трансформации 2,4,6-тринитротолуола. Более поздние этапы нитроредукции ТНТ штаммом *Bacillus cereus* ZS18 сопряжены со вторичным образованием гидроксильного радикала, что нехарактерно для штамма *Pseudomonas putida* EN1582. В процессе же трансформации 2,4,6-тринитротолуола клеточной суспензией *Lactobacillus plantarum* IL1 в системе обнаруживался исключительно гидроксильный радикал
3. Увеличение концентрации 2,4,6-тринитротолуола и количества интактных клеток приводило к усилению генерации супероксидного анион-радикала. Зависимость концентрации детектируемого супероксида от количества термически инактивированных клеток отсутствовала
4. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола суспензией растительных клеток *Fagopyrum tataricum* происходит по механизму нитровосстановления и сопряжена с усилением фонового уровня оксидативного стресса в культуре
5. Контакт клеток различного уровня организации с 2,4,6-тринитротолуолом приводит к изменению их физиологических свойств, что выражается в увеличении проницаемости мембран, замедлении роста колоний бактерий и гибели каллусных клеток в культуре растительной ткани

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Зиганшин А. М. Гидридное восстановление 2,4,6-тринитротолуола дрожжами – путь к его глубокой деструкции / А. М. Зиганшин, А. В. Наумов, Е. С. Суворова, **Е. А. Науменко**, Р. П. Наумова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 766–773.
2. **Науменко Е. А.** Участие кислорода в бактериальной трансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е. А. Науменко, А. В. Наумов, Е. С. Суворова, Р. Герлах, А. М. Зиганшин, А. П. Ложкин, Н. И. Силкин, Р. П. Наумова // Биохимия – 2008. - Т 73, №4. – С. 568-575
3. **Науменко Е. А.** Образование активных форм кислорода в процессе аэробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола бактериями / Е. А. Науменко, А. В. Наумов, А. М. Зиганшин, А. П. Ложкин, Н. И. Силкин, Р. П. Наумова; Казан. гос. ун-т. – Казань, 2006. – 20 с. – Деп. в ВИНТИ 27.12.2006, № 1617-B2006.
4. **Науменко Е.А.** Начальные продукты трансформации 2,4,6-тринитротолуола грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами // в сборнике научных трудов Международного биотехнологического центра МГУ. - М.: Спорт и Культура, - 2004. – С. 54-55.

5. Костычева Ю.Ф. К вопросу о ремедиации почв, загрязнённых взрывчатыми веществами / Ю.Ф. Костычева, А.М. Зиганшин, **Е.А. Науменко**, А.В. Наумов // Тез. докл. науч. конф. «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – М: Макс Пресс, - 2004. – С.101-102.
6. Костычева Ю.Ф. Метаболический блок на пути трансформации 2,4,6-тринитротолуола. / Ю.Ф. Костычева, С.А. Зарипов, **Е.А. Науменко**, Р.П. Наумова // Тез. докл. 8-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино- 2004. -с.151.
7. **Науменко Е.А.** Токсикологические аспекты микробной трансформации 2,4,6-тринитротолуола // В сб. науч. студ. работ «Биотехнология – охране окружающей среды» - М: Графикон-принт, - 2005. – С.339-341.
8. **Науменко Е.А.** Оценка острой токсичности экологически опасных нитросоединений в тесте MICROTOXTM / Е.А. Науменко, А.П. Ложкин, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Доклады Московского общества испытателей природы. – 2006.- т.39, - с.238.
9. Зиганшин А.М. Механизмы метаболической активации и детоксикации экологически опасных нитроароматических ксенобиотиков / А.М. Зиганшин, **Е.А. Науменко**, А.П. Ложкин, Р.П. Наумова // В сб. статей Росс. школы-конф. молодых учёных «Экотоксикология: современные биоаналитические системы, методы и технологии». – Пущино-Тула – 2006. –С.70-72.
10. Зиганшин А.М. Восстановление ароматического кольца 2,4,6-тринитротолуола дрожжами – обитателями нефтезагрязнённых почв и нефтешламов / А.М. Зиганшин, А.И. Гиндуллин, **Е.А. Науменко**, Р.П. Наумова // Доклады Московского общества испытателей природы. – 2006.- т.39, - с.220.
11. Сырова А.В. Оценка токсичности экологически опасных нитроароматических ксенобиотиков / А.В. Сырова, **Е.А. Науменко**, А.П. Ложкин // Тез. докл. международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2007». – Москва – 2007. –с.118-119.
12. Хиляс И.В. Микроорганизмы-деструкторы химических загрязнения осадков и почв / И.В. Хиляс, **Е.А. Науменко** // Тез. докл. международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2007». – Москва – 2007. – с.123.
13. **Naumenko E.A.** Generation of superoxide in 2,4,6-trinitrotoluene microbial transformation / E.A. Naumenko, A.P. Lozhkin, A.M. Ziganshin, R.P. Naumova, N.I. Silkin // Abstracts of the international conference “Modern development of magnetic resonance” – Kazan – 2007. – p.213-214.
14. Зиганшин А.М. Гидроксиламины как основные метаболиты трансформации 2,4,6-тринитротолуола / А.М. Зиганшин, **Е.А. Науменко**, А.П. Ложкин, А.Н. Крицкая, Р.П. Наумова // Тез. докл. 9-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино-2005. -с.102.
15. **Науменко Е.А.**, Динамика токсичности в процессе биотрансформации 2,4,6-тринитротолуола / Е.А. Науменко, А.П. Ложкин, А.М. Зиганшин, Р.П.

- Наумова // Тез. докл. 10-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино- 2006. -с.204.
16. Хиляс И.В. Редукция ароматического кольца 2,4,6-тринитротолуола – путь , ведущий к его разрушению / И.В. Хиляс, А.М. Зиганшин, **Е.А. Науменко**, Р.П. Наумова // Тез. докл. Региональной конф. молодых ученых с межд. участием «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии» - Екатеринбург-Пермь.- 2007.-с.29-30.
17. Субхангулова А.Р. Оценка функционального состояния бактериальных клеток в процессе трансформации 2,4,6-тринитротолуола / А.Р. Субхангулова, А.П. Ложкин, **Е.А. Науменко**, А.Р. Мухитов, В.В. Сальников, Р.П. Наумова // Материалы Всеросс. науч.-практ. конф. с межд. участием «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» - Киров-2007. – с.198-200.
18. Сырова А.В. Экспресс-биотестирование для оценки токсического потенциала 2,4,6-тринитротолуола и его метаболитов // А.В. Сырова, А.П. Ложкин, А.А. Данилова, **Е.А. Науменко**, Р.П. Наумова // Материалы Всеросс. науч.-практ. конф. с межд. участием «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» - Киров-2007. – с.195-197.
19. Сырова А.В. Трансформация 2,4,6-тринитротолуола молочнокислыми бактериями – путь к его частичной детоксикации /А.В. Сырова, А.П. Ложкин, **Е.А. Науменко**, Р.П. Наумова // Тез. докл. 11-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино- 2007. -с.48.
20. Субхангулова А.Р. К вопросу о биологической трансформации 2,4,6-тринитротолуола / А.Р. Субхангулова, **Е.А. Науменко**, А.П. Ложкин, Р.П. Наумова // Тез. докл. 11-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино- 2007. -с.47.
21. Хиляс И.В. Гидридное восстановление 2,4,6-тринитротолуола несовершенными грибами родов *Candida* и *Geotrichum* / И.В. Хиляс, **Е.А. Науменко**, А.П. Ложкин, А.М. Зиганшин, Р.П. Наумова // Тез. докл. 11-й Пущинской школы-конф. молодых учёных «Биология – наука XXI века». - Пущино- 2007. -с.51.
22. Ложкин А.П. Метаболическая активация и детоксикация тринитротолуола в процессе трансформации молочнокислыми бактериями, выделенными из нефтешлама / А.П. Ложкин, **Е.А. Науменко** // Материалы 60-й студ. конф. биологич. факультета «Биосистемы: организация, поведение, управление».-Нижний Новгород-2007. – с.49-51.